

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 1 月 4 日 (04.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/00230 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/44, (72) 発明者; および  
47/26, 9/19, A61P 43/00, 1/04, 25/00 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 池田義仁  
(IKEDA, Yoshihito) [JP/JP]; 〒207-0021 東京都東大和  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04138 市立野3-594-1 アルテミス立野305 Tokyo (JP). 佐藤裕  
美 (SATOU, Hiromi) [JP/JP]; 〒208-0013 東京都武蔵  
(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 23 日 (23.06.2000) 村山市大南4-23-2 クレール202 Tokyo (JP).  
(25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 多田公子, 外(TADA, Kimiko et al.); 〒162-  
0041 東京都新宿区早稻田鶴巻町519 石垣ビル2F Tokyo  
(26) 国際公開の言語: 日本語 (JP).  
(30) 優先権データ: (81) 指定国 (国内): US.  
特願平11/178227 1999 年 6 月 24 日 (24.06.1999) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 生化学工  
業株式会社 (SEIKAGAKU CORPORATION) [JP/JP];  
〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目1番5号  
Tokyo (JP). 株式会社 エルティーティー研究所 (LTT  
INSTITUTE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-0014 東京都千  
代田区永田町一丁目11番28号 Tokyo (JP).  
添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUG COMPOSITION CONTAINING LECITHIN-MODIFIED SUPEROXIDE DISMUTASE

(54) 発明の名称: レシチン化スーパーオキシドジスムターゼ含有医薬組成物

(57) Abstract: A drug composition comprising a lecithin-modified superoxide dismutase (PC-SOD) represented by the general formula (I) SOD' (9-B)m and a drug carrier and exhibiting specific properties, stability and so on: (I) (wherein SOD' is a superoxide dismutase residue; Q is a chemical crosslinkage; B is a residue obtained by freeing a lysolecithin having hydroxyl at the 2-position of glycerol from the hydroxyl hydrogen; and m is a positive number of 1 or above). This composition is little lowered in the activity of PC-SOD even after long-term storage by virtue of the action of sucrose in the composition, gives freeze-dried products having good properties, and is suppressed in the appearance of peaks assignable to analogues in column chromatography, thus being useful as the ingredient of drugs.

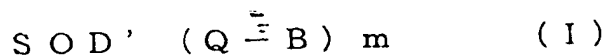
[続葉有]

WO 01/00230 A1



(57) 要約:

下記一般式 (I) :



(式中、SOD' はスーパーオキシドジスムターゼの残基を、Qは化学的架橋を、Bはグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンからその水酸基の水素原子を除いた残基を、mは1以上の正数を表す) で表されるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼ (PC-SOD) 及び医薬担体を含むし、特定の性状、安定性等を有する医薬組成物が提供される。本発明医薬組成物は、組成物中のシュークロースの作用により、長期間保存によるPC-SODの活性低下が少なく、凍結乾燥した場合の性状が良好で、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現が抑制されており、医薬品の成分として有用である。

## 明 細 書

## レシチン化スーパーオキシドジスムターゼ含有医薬組成物

## 技術分野

本発明は、レシチン化スーパーオキシドジスムターゼ（以下、単にPC-SODともいう）及び医薬担体、特にシュークロースを含有する医薬組成物、およびこれからなる疾患の処置剤に関する。また本発明は、シュークロースを有効成分とするPC-SODの活性低下等を抑制するための剤及び方法に関する。

## 背景技術

本発明に最も近い先行技術について説明する。

(a) 特開平9-117279号公報には、本発明において用いることができるPC-SODおよびこれを有効成分として含む医薬について記載されている。

(b) 特開平3-170438号公報には、レシチン化生物活性蛋白を含む経口及び局所投与用生物活性蛋白組成物が記載されている。また生物活性蛋白の例示としてスーパーオキシドジスムターゼ（以下、単にSODともいう）が記載されており、また添加物として砂糖が例示されている。

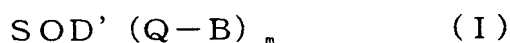
しかしながらこれらの先行技術には、PC-SOD及びシュークロースを含有する医薬組成物の特定の組み合わせについては記載されていない。またPC-SODの長期間保存による活性の低下、凍結乾燥した場合の性状、カラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現の問題については解決されていなかった。

## 発明の開示

本発明は、長期間保存によるPC-SODの活性低下が少なく（すなわち安定性が高く）、凍結乾燥した場合の性状が良好で、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現が抑制されたPC-SODを含有する医薬組成物を提供することを課題とする。

本発明者らは上記課題を解決するために、PC-SODを有効成分とする医薬組成物について鋭意検討を行った結果、医薬担体、特にシュークロースが、長期間保存によるPC-SODの活性低下を抑制し（安定性を保持させ）、凍結乾燥した場合の性状を良好に保ち、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制する作用を有することを見い出し、これにより上記課題を解決する医薬組成物が提供できることを見い出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、下記一般式（I）で表されるPC-SOD及び医薬担体、特にシュークロースを含有することを特徴とする医薬組成物（以下、本発明医薬組成物という）を提供する。



（式中、SOD' はスーパーオキシドジスムターゼの残基を表し、Qは化学的架橋を表し、Bはグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基を表し、mはスーパーオキシドジスムターゼ1分子に対するリゾレシチンの平均結合数であって、1以上の正数を表す）

また本発明は、本発明医薬組成物からなる、疾患の処置剤（以下、本発明処置剤ともいう）を提供する。

本発明医薬組成物は、好ましくは下記の性質を有する。

(a) 性状：この医薬組成物を凍結乾燥したものに注射用水（注射用蒸留水）を添加すると溶解し、不溶性異物は認められない。

(b) 安定性：この医薬組成物を凍結乾燥した直後における単位重量あたりのスーパーオキシドジスムターゼ活性を100とした場合、凍結乾燥した組成物を8℃で12ヶ月、25℃で12ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存した時点における該活性の相対値が、いずれも97%以上である。

(c) ゲル濾過クロマトグラフィーにおける類縁物質ピーク：凍結乾燥した組成物を再溶解し、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、溶出液の220nmの吸光度を測定した場合、当該吸光度の検出チャートにおけるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼのピークの形状と、凍結乾燥前のレシチン化スーパーオキシドジスムターゼの当該ピークの形状との間に、実質的な差が認められない。

(d) 逆相クロマトグラフィーにおける類縁物質ピーク：凍結乾燥した組成物を8℃

で12ヶ月、25℃で12ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存した時点で再溶解し、逆相クロマトグラフィーにかけ、溶出液の220nm及び270nmの吸光度を測定した場合、検出される類縁物質の量が、いずれも凍結乾燥した直後におけるものと実質的に変化しない。

本明細書で「溶解」とは、溶質（医薬組成物を凍結乾燥したもの）と溶媒（注射用水）が混合して、肉眼で観察して澄明な溶液が生じることをいう。「溶解」するか否かは、室温（1℃～30℃）下において、溶質に溶媒（注射用水）を添加して緩やかに振とうし、10秒以内に溶解するか否かで判断することが好ましい。

さらに本発明医薬組成物は、その凍結乾燥物を、8℃で36ヶ月、25℃で36ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存したいずれの時点においても上記(a)～(d)に記載の全性質を維持しているものであることが好ましい。

また本発明は、シュークロースを有効成分とする剤であって、上記一般式(I)で表されるPC-SODと共存させることにより該PC-SODの活性低下を抑制し、または、該PC-SODのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制するための剤（以下、本発明抑制剤ともいう）を提供する。

さらに本発明は、上記一般式(I)で表されるPC-SODにシュークロースを共存させることにより該PC-SODの活性低下を抑制し、または、該PC-SODのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制する方法（以下、本発明抑制方法ともいう）を提供する。

本発明医薬組成物は、組成物中の医薬担体、特にシュークロースの作用により、長期間保存によるPC-SODの活性低下が少なく（安定性が高く）、凍結乾燥した場合の性状が良好で、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現が抑制されているので、医薬品、例えば本発明処置剤の成分として有用である。

本発明処置剤は、長期間保存によるPC-SODの活性低下が少なく（安定性が高く）、凍結乾燥した場合の性状が良好で、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現が少ない医薬品として、例えば過剰な活性酸素に起因する疾患の処置剤として有用である。

また本発明抑制剤は、PC-SODの長期間保存による活性低下を抑制し（安定性を保持させ）、凍結乾燥した場合の性状を良好に保ち、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制する作用を有するので、本発明医薬組成物や本発明処置剤を調製する際に有用である。

#### 発明を実施するための最良の形態

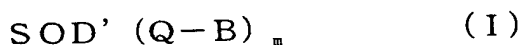
以下に、本発明の実施の形態を説明する。

##### < 1 > 本発明医薬組成物

###### (1) 本発明医薬組成物に用いるPC-SOD

本明細書における「レシチン」とは、フォスファチジルコリンを意味する通常のレシチンをいい、「リゾレシチン」とは、レシチンのグリセロールの2位に結合した脂肪酸1分子がとれて、2位の炭素原子に水酸基が結合した化合物をいう。

本発明医薬組成物に含有されるPC-SODは、通常、リゾレシチンの2位の水酸基に化学的架橋剤を結合させたレシチン誘導体を、SODに1個以上結合させて得ることができる。このPC-SODは次式(I)で示される。



上記一般式(I)中、SOD'はスーパーオキシドジスムターゼの残基を表す。

前記式(I)中のSOD'は、生体内の活性酸素 $\text{O}_2^-$ の分解というその本来の機能を発揮し得る限りにおいて、その起源等は特に限定されるものではなく、各種の動植物又は微生物に由来するSODの残基を広く用いることが可能である。しかしながら、医薬品用途のSODとしては、生体内での抗原性を可能な限り減じることが好ましいことを考慮すれば、本発明医薬組成物を投与する動物種に応じて、適宜適切なSODを選択することが好ましい。例えば、最も本発明医薬組成物が必要とされと考えられるヒトを対象とする場合には、SODとしてヒト体内における抗原性を可能な限り減ずるべく、ヒト由来のSODを用いることが好ましい。そしてその中でも、ヒト由来のCu/Zn SOD（活性中心に銅と亜鉛を含むヒト由来のSOD；以下、ヒトCu/Zn SODと略記することもある）が、細胞内における発現量が多く、また遺伝子工学的手法による生産技術が確立しており、大量に調製することが可能であるため、特に好ましい。

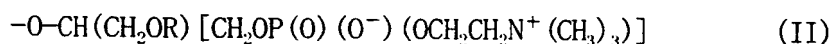
このヒトCu/Zn SODには、ヒト組織から製造される天然のヒトCu/Zn SOD；遺伝子工学的手法により製造されるヒトCu/Zn SOD；天然のヒトCu/Zn SODと実質上同一のアミノ酸配列を有する組換えヒトCu/Zn SOD、これらのヒトCu/Zn SODのアミノ酸配列中の一部のアミノ酸を化学的に修飾もしくは改変したSOD等があり、いずれのヒトCu/Zn SODであってもよい。

参考のため、この天然のヒトCu/Zn SODのタンパク質のアミノ酸配列を配列番号1に示す。なお、実際のヒトCu/Zn SODは、このアミノ酸配列を有するタンパク質が二量体（ダイマー）となっている。

このタンパク質におけるアミノ酸配列に示すごとく、天然のヒトCu/Zn SODの111位のアミノ酸はシステインであるが、蛋白工学的手法、例えば部位特異的変異法により、この111位をセリンに変換したヒトCu/Zn SOD（特開昭62-130684号公報）や、化学的にこの111位のシステインを修飾したヒトCu/Zn SOD（特開平6-199895号公報）も報告されており、これらのヒトCu/Zn SODを素材として、本発明におけるPC-SODを得ることができる。そして、これらのヒトCu/Zn SODのうちでも、電荷的及び分子量的に均一であり、かつSOD活性が安定している、111位のシステインを化学的に修飾した、例えばこのシステインをS-（2-ヒドロキシエチルチオシステイン）とした、ヒトCu/Zn SODを素材として、本発明におけるPC-SODを得るのが好ましい。

なお本明細書においては、このようにヒトCu/Zn SODにおいて部位特異的変異法等により一部アミノ酸を変換したものや、ヒトCu/Zn SODの一部のアミノ酸を化学的に修飾して得られるものも含めて、単にヒトCu/Zn SODという。

また、前記式（I）中のBで示される「グリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンの、その水酸基の水素原子を除いた残基」は、次式（II）で表される。



（式中、Rは脂肪酸残基（アシル基）である）

Rは、炭素数10～28の飽和又は不飽和の脂肪酸残基が好ましく、より好ま

しくはミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基、イコサノイル基、ドコサノイル基、その他炭素数が14～22の飽和脂肪酸残基であり、特に好ましくは炭素数16の飽和脂肪酸残基であるパルミトイル基である。

また前記式(I)中のQは化学的架橋を表す。化学的架橋は、SODとレシチンとを架橋して化学的に結合(共有結合)させ得るものであれば特に限定されない。化学的架橋としては、残基 $-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-$ が例示され、かつ好ましい。この残基は、式 $HO-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-OH$ で表される直鎖状ジカルボン酸の両端の水酸基を除いた残基、もしくは、このジカルボン酸の無水物、このジカルボン酸のエステル、このジカルボン酸のハロゲン化物、又はその他のこのジカルボン酸の反応性誘導体等の両端における水酸基に対応する部分を除いた残基であるものが好ましい。前記式(I)中のQが上記直鎖状ジカルボン酸の残基である場合、Qの一端とBとは、エステル結合で連結している。また、この場合、このQの他端は、SODのアミノ基とアミド結合などにより直接結合していると考えられる。この場合、SOD'は、SODの結合に関与するアミノ基から水素原子を1つ除いた残基を示す。なお前記の化学的架橋において、基 $-(CH_2)_n-$ におけるnは2以上の整数であり、好ましくは2～10の整数であり、特に好ましくは3である。

また前記式(I)中のmは、SOD1分子に対するリゾレシチンの平均結合数を表している。mは1以上の正数であり、1～12の正数が好ましく、4が特に好ましい。

PC-SODの製造において、レシチン誘導体のSODへの結合は、公知の方法、例えば特開平6-54681号公報に記載された方法に従って行うことが可能である。このPC-SODの製造過程は、実施例中に記載する。

本発明医薬組成物に用いるPC-SODは、医薬として使用できる程度に精製され、医薬として混入が許されない物質を実質的に含まないものであることが好ましい。

例えばPC-SODは、2,500 U/mg(PC-SOD)以上の比活性を有する精製されたものを用いるのが好ましく、3,000 U/mg(PC-SOD)以上の比活性を有する精製されたものがより好ましい。なお、本明細書において1U(ユニット)とは、pH7.8、30℃



の条件下でNBT(ニトロブルーテトラゾリウム)を用いてJ. Biol. Chem. Vol. 244, No. 22, 6049-6055(1969)に準じた方法により測定し、NBTの還元速度を50%阻害するPC-SODの酵素量を表す。

## (2) 本発明医薬組成物に用いる医薬担体

本発明医薬組成物に用いる担体は、該医薬組成物が前記(a)～(d)に記載の全性質を満たすものであれば特に限定されないが、溶解性及び安定性の点でシュクロースが最も好ましい。本発明医薬組成物に用いるシュクロースは、医薬として使用できる程度に精製され、医薬として混入が許されない物質を実質的に含まないものであり、活性炭で処理されたシュクロースが好ましい。活性炭による処理は、シュクロースを水溶液とし、これと活性炭とを接触させることにより行うことができる。このような活性炭処理により、たとえばシュクロース中のエンドトキシン濃度を低減させることができ、類縁物質ピークの出現をさらに抑制でき、かつ安定性をさらに向上させうる。

本発明医薬組成物に用いる医薬担体、特にシュクロース中のエンドトキシン濃度は、0.25 EU/mg 以下が好ましく、検出限界(0.006 EU/ml)以下がより好ましい。

なお医薬担体、特にシュクロース中のエンドトキシン濃度は、公知のエンドトキシンの測定法を用いて測定することができるが、カプトガニ・アメボサイト・ライセート成分を用いるリムルス試験法が好ましい。リムルス試験法に用いるリムルス試薬としては、エンドトキシン特異的リムルス試薬を用いることが好ましい。リムルス試薬としては、例えば次に挙げる市販のリムルス試薬を用いることができる；トキシカラーシステムLS-6, LS-20, LS-50M、エンドスペシーES-6, エンドスペシーES-200(生化学工業株式会社)。

## (3) 本発明医薬組成物

本発明の医薬組成物は、PC-SODと医薬担体、特にシュクロースを含む。該組成物は(1)で説明したPC-SODと、(2)で説明した医薬担体、特にシュクロースを配合することにより得るのが好ましい。これにより、長期間保存によるPC-SODの活性低下が少なく(安定性が高く)、凍結乾燥した場合の性状が

良好で、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の時に類縁物質ピークの出現が抑制された本発明医薬組成物を得ることができる。

本発明医薬組成物中のPC-SODと医薬担体、特にシュークロースの配合比率は、投与量、本発明医薬組成物の形態等に応じて当業者が適宜決定でき、特に限定されないが、「PC-SOD/医薬担体、特にシュークロース」の重量比として0.1/100～80/100程度が好ましく、0.4/100～60/100程度がより好ましい。

また本発明医薬組成物は、その脂肪酸含量が、 $0.13 \sim 0.15 \mu\text{mol} / \text{mg}$  蛋白であることが好ましい。脂肪酸含量は、例えば(株)ワイエムシイ社製「長鎖、短鎖脂肪酸分析キット」を用いて測定することができる。

なお本発明医薬組成物には、PC-SODの酵素活性に悪影響を与えず、かつ本発明の効果に影響を与えない限りにおいて、他の医薬活性成分や、慣用の賦形剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、崩壊剤、緩衝剤、等張化剤、保存剤、無痛化剤等、通常医薬に用いられる成分を添加することができる。このような成分としては、生理学上許容され、医薬として使用できる程度の純度であり、かつ医薬として混入が許されない物質を実質的に含まないものを使用できる。

本発明医薬組成物の製造は、PC-SOD及び医薬担体、特にシュークロースを用い、製剤学的に公知の方法を用いて行なうことができる。なお本発明医薬組成物は、溶液状、凍結状、または凍結乾燥状の形態が好ましい。なお溶液状の形態としては、以下の(1)および(2)の態様も包含される。

(1)凍結状態とした場合の本発明医薬組成物における、凍結前および融解後における溶液状態。

(2)凍結乾燥状態とした場合の本発明医薬組成物における、凍結乾燥前および溶媒添加による再溶解後の溶液状態。

これらの中で、本発明医薬組成物の形態は凍結乾燥状の形態とするのが好ましい。すなわち本発明医薬組成物は凍結乾燥医薬組成物であることが好ましい。

凍結乾燥は、公知の凍結乾燥手法に従って、当業者が適宜条件等を設定して行うことができる。例えば市販の凍結乾燥機を用い、以下のステップ(1)～(5)の順に実行されるよう設定して行うことができる。なお( )内は、各段階に要する時間を示した。

(1) 冷却する。例えば、室温から $-40^{\circ}\text{C}$ ～ $-50^{\circ}\text{C}$ まで冷却する (0.3～1.5 時間程度)。

(2) 真空状態を維持しながら冷却状態を維持する。例えば、 $-40^{\circ}\text{C}$ ～ $-50^{\circ}\text{C}$ を維持する (12 時間以上)。

(3) 真空状態を維持しながら冷却状態から室温まで戻す。例えば、 $-40^{\circ}\text{C}$ ～ $-50^{\circ}\text{C}$ から室温まで戻す (3～15 時間程度)。

(4) 真空状態を維持しながら室温を維持する (例えば 3～20 時間程度)。

(5) 復圧する。

ステップ(1)～(5)からなる凍結乾燥医薬組成物の製造においては、上記のステップ(2)に要する時間を工夫するのが好ましく、該時間が、12 時間以上であることが好ましい。

凍結乾燥医薬組成物としては、その性質が下記(a)～(d)の全ての条件を満たすものが特に好ましい。

(a) 性状：凍結乾燥医薬組成物を肉眼で観察した場合、凍結乾燥組成物のケーキの形状が錠剤状であり、かつ凍結乾燥組成物に注射用水を添加した場合、速やかに溶解し、かつ不溶性異物を認めない (凍結乾燥医薬組成物の性状が良好に保持されている)。通常、注射用水に10 秒以内に溶解する。

(b) 安定性：凍結乾燥直後の単位重量あたりの酵素活性を100 (%)とした場合、凍結乾燥組成物を $8^{\circ}\text{C}$ で12 ヶ月、 $25^{\circ}\text{C}$ で12 ヶ月、又は $40^{\circ}\text{C}$ で6 ヶ月間保存した時の酵素活性の相対値(%)が97 %以上、好ましくは99 %以上である。この安定性は、後述する実施例1中の「(1-2-2)安定性試験」に記載された方法で測定できる。

(c) ゲル濾過クロマトグラフィーによる類縁物質ピーク： $220\text{ nm}$ の吸光度を測定した場合、当該吸光度の検出チャートにおけるPC-SOD (凍結乾燥医薬組成物)のピークの形状と、凍結乾燥前のPC-SODの当該ピークの形状との間に、実質的な差が認められない。該クロマトグラフィーは、後述する実施例1中の「(1-2-3-1)ゲル濾過クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験」に記載された方法で測定するのが好ましい。

(d) 逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピーク：凍結乾燥組成物を $8^{\circ}\text{C}$ で12

ヶ月、25℃で12ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存した時における、220nm及び270nmの吸光度の測定により検出される類縁物質の量が、凍結乾燥直後と実質的に変化しない。該クロマトグラフィーは、後述する実施例1中の「(1-2-3-2)逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験」に記載された方法で測定するのが好ましい。

さらに本発明医薬組成物は、その凍結乾燥物を、8℃で36ヶ月、25℃で36ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存したいずれの時点においても上記(a)～(d)に記載の全性質を維持しているものであることが好ましい。

本発明にいう類縁物質は、主としてレシチンが種々の部分で切断されて生成した種々の物質からなり、遊離脂肪酸等が含まれる。これらの類縁物質はPC-SODに結合していたレシチンが切断されて生成するものと考えられ、PC-SODに結合していたレシチンが多量に切断されると、PC-SODとしての機能が減じられ、またそのような類縁物質が多量に含まれるとその医薬品としての品質、規格等の管理上好ましくない。

本発明医薬組成物、さらには該組成物を種々の形態にしたものは、そのまま医薬品として投与するための最終剤形として用いるが、他の剤形の医薬品、例えば、液剤、凍結乾燥剤等の原料として使用することもできる。

本発明医薬組成物は、PC-SODを有効成分とする注射用製剤として使用するのが好ましい。例えば、本発明医薬組成物を溶液状態の注射用製剤として提供する場合、前記の方法で製造される溶液状態の本発明医薬組成物を、アンプル、バイアル、注射用シリンジ等の適当な容器に充填・密封し、そのまま流通させあるいは保存し、注射剤として投与に供することができる。

本発明医薬組成物を凍結状態の注射用製剤として提供する場合、アンプル、バイアル、注射用シリンジ等の適当な容器中に、凍結状態の本発明医薬組成物を密封状態で保持させて、流通させあるいは保存し、投与前に融解させて注射剤として投与に供することができる。

また、本発明医薬組成物を凍結乾燥状態の注射用製剤として提供する場合、アンプル、バイアル、注射用シリンジ等の適当な容器中に前記の方法で製造される凍結乾燥状態の本発明医薬組成物を密封状態で保持させて、流通させあるいは保

存し、投与前に注射用蒸留水で溶解し、注射剤として投与に供することができる。凍結乾燥状態の本発明医薬組成物は、溶解用の溶媒とセットで提供してもよい。

注射用製剤としては、凍結乾燥状態のものが好ましい。すなわち、本発明医薬組成物は注射用凍結乾燥組成物の形態であることが特に好ましい。

## < 2 > 本発明処置剤

本発明処置剤は、本発明医薬組成物からなる疾患の処置剤である。また本発明処置剤は、各種疾患の治療剤、予防剤、悪化防止剤、改善剤等の概念をも包含する。本発明処置剤の構成成分として用いるPC-SOD、シュークロース、これらの配合量、含有させてもよい他の成分、剤型等は、上記の本発明医薬組成物と全く同じ態様が採用できる。

本発明処置剤を適用できる疾患は、PC-SODの作用によって処置（治療、予防、維持（悪化防止）、軽減（症状の改善）等）が可能な疾患である限りにおいて特に限定されない。

PC-SODの作用によって処置が可能な疾患としては、過剰な活性酸素に起因する疾患が挙げられるが、より具体的には運動ニューロン疾患（例えば筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、家族性痙攣性麻痺、シャルコー・マリ一足、進行性球麻痺、若年性一側上肢筋萎縮症（平山病）等）、虚血再灌流障害、急性腎不全（腎前性急性腎不全、腎性急性腎不全、腎後性急性腎不全等）、ループス腎炎（正常糸球体におけるループス腎炎、メサングウム増殖性変化を伴うループス腎炎、巣状分節状糸球体腎炎、びまん性増殖性糸球体腎炎、びまん性膜性糸球体腎炎、末期硬化性糸球体腎炎等）、脳血管障害（脳出血、高血圧性脳内出血、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、一過性脳虚血発作、高血圧性脳症等）に伴う機能障害（発語障害、麻痺による運動機能障害、視覚障害、聴覚障害、嗅覚障害、味覚障害等の感覚障害、痴呆等）、間質性肺炎、線維症（肺線維症等）、潰瘍性胃腸障害（潰瘍性大腸炎、クローン病等）、関節炎、熱傷等が挙げられ、これらのなかでも運動ニューロン疾患（特にALS）や潰瘍性胃腸障害（特に潰瘍性大腸炎やクローン病）が好ましい適用疾患である。また線維症（特に肺線維症）、間質性肺炎も好ましい適用疾患である。

本発明処置剤は、含有するPC-SODの働きで、これらの疾患並びにこれら疾患に伴う症状に対して改善作用を有する。なお、ここに挙げた疾患名は例示であり、かかる例示疾患に本発明処置剤の適用範囲は限定されない。

本発明においては、対象となる疾患の性質や進行段階に応じて、後述する剤形を本発明処置剤の剤形として適宜選択することが好ましい。

本発明処置剤は、注射（筋肉内、皮下、皮内、静脈内等）、経口、吸入等の投与方法によって、経口あるいは非経口的に投与することができ、投与方法に応じ適宜製剤化することができる。剤形としては、注射剤（溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等）、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤、リポ化剤、ゲル剤、外用散剤、スプレー剤、吸入散剤、坐剤等が挙げられるが、注射剤が好ましく、静脈内投与用の注射剤とすることがより好ましい。

本発明処置剤中の有効成分（PC-SOD）の量および当該処置剤の投与量は、製剤調製の方法、剤形、疾患の種類、当該処置剤の投与方法、投与形態、使用目的、患者の具体的症状（疾患の程度）、患者の体重等によって個別的であり特に限定されないが、例えば、臨床量として成人1人1日当たり0.5～100mg（1500～300000 U）を例示することができる。また、上記製剤の投与間隔は1日1回程度でも可能であり、3～4回に分けて投与することも可能である。

また本発明処置剤は、前記の疾患を発症しうる脊椎動物、特に哺乳動物に投与する処置剤とすることができるが、ヒトの処置剤とすることが好ましい。

### < 3 > 本発明抑制剤及び本発明抑制方法

上記の通り、PC-SODにシュークロースを共存させることにより該PC-SODの活性低下を抑制し、または、該PC-SODのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制することができる。

従って本発明抑制剤は、シュークロースを有効成分とする剤であって、前記一般式（I）で表されるPC-SODと共存させることにより該PC-SODの活性低下を抑制し、または、該PC-SODのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制するための剤である。好ましくは、前記PC-SODの活性低下の抑制、および該PC-SODのカラムクロマトグラフィー

一による分析の際の類縁物質ピークの出現の抑制の両方の目的のために使用される剤である。

なお本発明抑制剤は、凍結乾燥医薬組成物の調製の際にPC-SODと共存させると、上記の抑制効果に加えてさらに凍結乾燥医薬組成物の性状を良好に保持させるという効果を発揮する。従って本発明抑制剤は、特に、前記PC-SODを含有する凍結乾燥医薬組成物を調製する際に前記PC-SODと共存させて用いることが好ましい。

また本発明抑制方法は、上記一般式(I)で表されるPC-SODにシュークロースを共存させることにより該PC-SODの活性低下を抑制し、または、該PC-SODのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制する方法である。好ましくは、本発明抑制方法は、前記PC-SODの活性低下の抑制、および該PC-SODのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現の抑制の両方の目的のために使用される。

本発明抑制剤の有効成分として用いるシュークロース、また本発明抑制方法に用いられるシュークロース、及びそのPC-SODへの添加量等は、前記<1>に記載したものと同様である。

またPC-SODの活性低下抑制、カラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現抑制、また凍結乾燥医薬組成物の調製に用いた場合における凍結乾燥医薬組成物の性状の良好な保持は、後述の実施例に記載された方法で確認することができる。

## 実施例

以下に、本発明を製造例及び実施例により具体的に説明する。しかしながら、これらにより本発明の技術的範囲が限定されるべきものではない。

### [製造例]

#### <1>ヒトCu/Zn SODの調製

該SODは、特開平6-199895号公報に記載された方法で調製したものをを用いた。このヒトCu/Zn SODの111位のアミノ酸はS-(2-ヒドロキシエチル

チオ) システインとなっている。

## < 2 > PC-SODの調製

PC-SODは、特開平 6-54681 号公報に記載された方法によって、2-(4-ヒドロキシカルボニルブチロイル) リゾレシチンの活性エステル体を調製し、これと上記< 1 >のSODとを反応させることによって調製した。精製・濃縮後、蛋白質濃度をローリー法(Lowry, O. h. ら、J. Biol. Chem., 193 巻, 265 頁 (1951 年))、SODの残存アミノ基をTNBS法(トリニトロベンゼンスルホン酸塩、Goodwin, J. F. ら、Clin. Chem., 16 巻, 24 頁 (1970 年))で分析することにより、SOD 1 分子あたりのレシチン誘導体の結合数を求めたところ、平均 4. 0 個であった。このPC-SODの水溶液は青緑色～緑色を呈し、pHは7～8であった。また、分子量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により調べたところ、PC-SODサブユニットのモノマー(PC-SODはサブユニットのホモダイマーである) あたり約18000であった。

## 〔実施例 1〕

本実施例において「PEG4000」とは、ポリエチレングリコール(平均分子量4000)をいう。

(1) 以下、本実施例で用いた方法をまとめて説明する。

### (1-1) 凍結乾燥

凍結乾燥機(モデル No. RL402BS; 共和真空製)を用いて溶液組成物を凍結乾燥した。なお凍結乾燥のプログラムは、下記表 1 のステップ(1)～(5)の順に実行されるよう設定した。



表 1

ステップ	圧力	温度	所要時間
(1)	冷却	25℃→-40℃	0.5時間
(2)	真空状態を維持	-40℃で維持する	12時間
(3)	真空状態を維持	-40℃→25℃	12時間
(4)	真空状態を維持	25℃で維持	16.5時間
(5)	窒素ガスで復圧	25℃で維持	数秒

## (1-2) 各種試験方法

## (1-2-1) 性状試験

凍結乾燥された組成物について、以下の方法で組成物の性状を調べた。

肉眼で観察して、凍結乾燥組成物のケーキの形状が錠剤状であり、かつ凍結乾燥組成物に注射用水を添加した際、10秒以内に溶解し、かつ不溶性異物を認めなかったものを「○」、凍結乾燥組成物のケーキの形状が錠剤状でなかったもの、又は凍結乾燥組成物に注射用水を添加した際、10秒以内に溶解しなかったか若しくは不溶性異物を認めたものを「×」として評価した。

## (1-2-2) 安定性試験

凍結乾燥された組成物について、以下の方法で組成物中のPC-SODの酵素活性を測定した。

凍結乾燥組成物に注射用水を添加して再溶解した溶液を用い、pH7.8、30℃の条件下でNBT(ニトロブルーテトラゾリウム)を用いて J. Biol. Chem. Vol. 244, No. 22, 6049-6055 (1969) に準じた方法により測定し、NBTの還元速度を50%阻害する酵素量を1Uとして求めた。凍結乾燥直後の酵素活性を100(%)とした時の保存後の酵素活性の相対値(%)を求めた。

(1-2-3) カラムクロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験

(1-2-3-1) ゲル濾過クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験 (以下、「GPC」と略記することもある)

凍結乾燥組成物に注射用水を添加して再溶解した溶液を試料とし、以下のカラム及び移動相を用いた高速液体クロマトグラフィーに付した。

カラム：YMC-Pack Diol-200 ((株)ワイエムシイ製)

移動相：45%アセトニトリル/0.01M リン酸緩衝液

溶出液の220nmの吸光度を連続的に検出し、その検出チャートを得た。検出チャートにおけるPC-SODのピークの形状が、凍結乾燥前のPC-SODのピークの形状と実質的な差が認められなかった場合を「○」、凍結乾燥前のPC-SODのピークには認められないピークが認められた場合を「×」として評価した。

(1-2-3-2) 逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験 (以下、「CN」と略記することもある)

上記(1-2-3-1)と同様に試料を調製し、以下のカラム及び移動相を用いた高速液体クロマトグラフィーに付した。

カラム：シアノプロピル化シリカゲル ((株)ワイエムシイ製)

移動相：アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸 (アセトニトリルの20%~90%の濃度勾配により溶出)

溶出液の220nm及び270nmの吸光度を連続的に検出した。PC-SODのピーク (主要なピーク) の前に出現するピーク群 (類縁物質のピーク群) の合計面積 (SI) と、PC-SODのピークとSIとの合計面積 (ST) を測定し、各々のサンプルについて類縁物質の量 ( $SI/ST$ ; %) を算出した。

なお、後述の表7と表8については、比較を容易にするために、処方1における凍結乾燥直後の類縁物質の量を1としたときの相対値で示した。

(2) PC-SOD 含有医薬組成物についての試験

## (2-1)組成物中の成分の種類による影響 1

前記製造例で製造したPC-SOD(0.4mg/バイアル)及び下記の表2に示した各種成分(表中のカッコ内の数値は1バイアルあたりの重量を示す)を注射用水に溶解して溶液組成物を製造し、これを凍結乾燥した。

この凍結乾燥物を、前記の各種試験に付した。結果を表2に示す。

評価項目中1つでも×があったものは「×」と判定し、評価項目中全く×がなかったものを「◎」と判定した。

表 2

成分	性状試験	G P C	判定
アラニン(20mg)	○	×	×
イノシトール(20mg)	○	×	×
マンニトール(20mg)	○	×	×
ソルビトール(20mg)	×	○	×
シュークロース(20mg)	○	○	◎
クレアチニン(10mg)	×	×	×
グリシン(20mg)	○	×	×
PEG4000(0.5mg)	○	×	×
尿素(20mg)	○	×	×
なし	×	×	×

表2の結果から、PC-SODはシュークロースと共に配合することによって、極めて凍結乾燥医薬組成物の性状が良好となり、またカラムクロマトグラフィー(G P C)による分析の際の類縁物質ピークの出現が抑制されることが明らかになった。

## (2-2)成分の種類による影響2

前記製造例で製造したPC-SOD及び下記の表3に示した各種成分を注射用水に溶解して溶液組成物を製造し、0.5 mL ずつバイアルに分注し、前記の方法で凍結乾燥した。

なお表中の重量は、1 バイアル中に含有される重量を示し、「—」は配合していないことを示す。

表 3

	PC-SOD	シュクロース	PEG4000	ソルビトール	マンニトール
処方 1	2mg	100mg	—	—	—
処方 2	2mg	5mg	10mg	—	—
処方 3	2mg	—	—	5mg	10mg
処方 4	2mg	—	10mg	5mg	—

上記処方 1～4 の凍結乾燥医薬組成物を、以下の(a)～(d)の時点において、性状試験、安定性試験、ゲル濾過クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験および逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験に付した。

- (a)凍結乾燥直後（保存せず）
- (b)凍結乾燥後、4 0℃で3ヶ月間保存した時点
- (c)凍結乾燥後、2 5℃で3ヶ月間保存した時点
- (d)凍結乾燥後、8℃で3ヶ月間保存した時点（処方 1 については6ヶ月間保存した時点）

各試験の結果を表 4～表 7 に示す。

## (1)性状試験

表 4

	(a)	(b)	(c)	(d)
処方	凍結乾燥直後	40℃ 3ヶ月	25℃ 3ヶ月	8℃ 3(6)ヶ月
1	○	○	○	○
2	○	○	○	○
3	○	○	○	○
4	○	○	○	○

いずれの処方も、良好な性状を示した。

## (2) 安定性試験

表 5

	(a)	(b)	(c)	(d)
処方	凍結乾燥直後	40℃ 3ヶ月	25℃ 3ヶ月	8℃ 3(6)ヶ月
1	100	100	110	102
2	100	97	114	110
3	100	114	103	102
4	100	99	94	91

ソルビトールとポリエチレングリコールとを含有する処方（処方4）は、他の処方に比してPC-SOD活性の低下が大きかった。

## (3) ゲル濾過クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験

表 6

	(a)	(b)	(c)	(d)
処方	凍結乾燥直後	40℃ 3ヶ月	25℃ 3ヶ月	8℃ 3(6)ヶ月
1	○	○	○	○
2	○	○	○	○
3	○	N. T.	N. T.	○
4	○	○	○	○

表 6 中、N. T. は試験していないことを示す。

いずれの処方も、ゲル濾過クロマトグラフィーによる類縁物質ピークは検出されなかった。

## (4) 逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの検出試験 (220 nm)

表 7

	(a)	(b)	(c)	(d)
処方	凍結乾燥直後	40℃ 3ヶ月	25℃ 3ヶ月	8℃ 3(6)ヶ月
1	1	1.0	1.0	1.1
2	1.5	1.8	1.6	1.8
3	1.5	3.4	2.2	1.8
4	1.4	3.4	2.2	1.8

ソルビトールとマンニトールとを含有する処方（処方3）及びソルビトールとポリエチレングリコールとを含有する処方（処方4）では、逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピークの面積が、シュークロースを含有する処方（処方1）の約1.4～3.4倍であった。

また上記処方において、PC-SODの含量を0.4mg、あるいは10mgとしたものについても同様に実験をした結果、同様の結果が得られた。

以上の結果から、PC-SOD及びシュークロースを含有する凍結乾燥組成物は、他の処方に比して、(1)性状が良好であり、かつ(2)長期間の保存による酵素活性の低下が非常に少なく（極めて安定である）、かつ(3)ゲル濾過クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによる類縁物質ピークが極めて少ないという極めて有利な効果を有することが見いだされた。

#### 〔実施例2〕

PC-SOD及びシュークロースを含有する凍結乾燥組成物が、より長期間の保存に耐えうるか否かを調べるために、以下の試験を行った。

上記の処方1によりPC-SODを含有する凍結乾燥組成物を製造し、以下の(e)～(h)の時点において、実施例1と全く同様の方法で各種試験を行った。本試験においては各処方においてそれぞれ3ロットを試験に供した。

(e)凍結乾燥直後（保存せず）

(f)凍結乾燥後、40℃で6ヶ月間保存した時点

(g)凍結乾燥後、25℃で12ヶ月間(g-1)、24ヶ月間(g-2)、36ヶ月間(g-3)保存した時点

(h)凍結乾燥後、8℃で12ヶ月間(h-1)、24ヶ月間(h-2)、36ヶ月間(h-3)保存した時点

試験の結果をまとめて表8に示す。

表 8

試験	(e)	(f)	(g-1)	(g-2)	(g-3)	(h-1)	(h-2)	(h-3)
凍結乾燥		40℃	25℃	25℃	25℃	8℃	8℃	8℃
直後		6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月	36ヶ月	12ヶ月	24ヶ月	36ヶ月
性状	○	○	○	○	○	○	○	○
安定性	100	102	106	111	112	105	110	105
GPC	○	○	○	○	○	○	○	○
CN	1.0	1.2	1.0	1.0	1.1	0.9	1.0	1.1
	1.0	1.3	1.0	0.6	1.1	0.9	0.8	1.1

(CNの欄における上段は220nm、下段は270nmの結果を示す)



またこの処方において、PC-SODの含量を0.4mg、あるいは10mgとしたものについても同様に実験した結果をそれぞれ表9及び表10に示す。

表 9

試験	(e) 凍結乾燥 直後	(f) 40℃ 6ヶ月	(g-1) 25℃ 12ヶ月	(g-2) 25℃ 24ヶ月	(g-3) 25℃ 36ヶ月	(h-1) 8℃ 12ヶ月	(h-2) 8℃ 24ヶ月	(h-3) 8℃ 36ヶ月
性状	○	○	○	○	○	○	○	○
安定性	100	104	104	110	104	104	110	108
GPC	○	○	○	○	○	○	○	○
CN	1.0	1.0	0.8	0.9	1.0	0.7	0.9	1.1
	1.0	1.6	0.9	0.7	1.0	0.8	0.7	1.1

(CN)の欄における上段は220nm、下段は270nmの結果を示す)

表 10

試験	(e)	(f)	(g-1)	(g-2)	(g-3)	(h-1)	(h-2)	(h-3)
凍結乾燥		40℃	25℃	25℃	25℃	8℃	8℃	8℃
直後		6ヶ月	12ヶ月	24ヶ月	36ヶ月	12ヶ月	24ヶ月	36ヶ月
安定性	100	101	104	108	110	104	104	105
GPC	○	○	○	○	○	○	○	○
CN	1.0	1.2	1.0	1.1	1.2	1.1	1.0	1.1
	1.0	1.1	0.9	0.8	1.1	0.9	0.8	1.1

(CNの欄における上段は220nm、下段は270nmの結果を示す)

### [実施例 3]

前記製造例で製造した PC-SOD 30mg 及びシュークロース 50mg を注射用水に溶解して溶液組成物を製造し、1.5mL ずつバイアルに分注し、前記の方法で凍結乾燥した。

上記組成物の凍結乾燥直後、8℃で9ヶ月保存した時点において、比活性の測定方法を除き、実施例1と全く同様の方法で各種試験を行った。比活性は、凍結乾燥組成物に注射用水を添加して再溶解した溶液を用い、pH 7.8、25℃の条件下でシトクロムCを用いて J. Biol. Chem., Vol. 244, No. 22, 6049-6055 (1969) に準じた方法により測定し、シトクロムCの還元速度を50%阻害する酵素量を1Uとして求めた。凍結乾燥直後の酵素活性を100(%)とした時の保存後の酵素活性の相対値(%)を求めた。試験の結果を表11に示す。

表 1 1

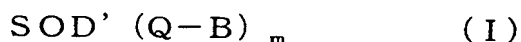
試験	凍結乾燥直後	8℃6ヶ月	8℃9ヶ月	25℃6ヶ月
性状	○	○	○	○
安定性	100	104	123	109
GPC	○	○	○	○
CN	1.0	1.2	1.0	1.2
	1.0	1.3	1.1	1.3

(CNの欄における上段は220nm、下段は270nmの結果を示す)

以上の結果から、シュークロースは、従来知られている医薬担体(結合剤)としての効果の他に、PC-SODに添加することによって長期間保存後でも凍結乾燥医薬組成物の性状を良好に保持し、PC-SOD活性の低下を抑制し(安定に保持し)、かつゲル濾過クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークを抑制する等の効果を発揮することが示された。

## 請求の範囲

1. 下記一般式 (I) で表されるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼ及び医薬担体を含む、下記の性質を有することを特徴とする医薬組成物。



(式中、SOD' はスーパーオキシドジスムターゼの残基を表し、Qは化学的架橋を表し、Bはグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基を表し、mはスーパーオキシドジスムターゼ1分子に対するリゾレシチンの平均結合数であって、1以上の正数を表す)

- (a) 性状: この医薬組成物を凍結乾燥したものに注射用水を添加すると溶解し、不溶性異物は認められない。
- (b) 安定性: この医薬組成物を凍結乾燥した直後における単位重量あたりのスーパーオキシドジスムターゼ活性を100とした場合、凍結乾燥した組成物を8℃で12ヶ月、25℃で12ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存した時点における該活性の相対値が、いずれも97%以上である。
- (c) ゲル濾過クロマトグラフィーにおける類縁物質ピーク: 凍結乾燥した組成物を再溶解し、ゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、溶出液の220nmの吸光度を測定した場合、当該吸光度の検出チャートにおけるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼのピークの形状と、凍結乾燥前のレシチン化スーパーオキシドジスムターゼの当該ピークの形状との間に、実質的な差が認められない。
- (d) 逆相クロマトグラフィーにおける類縁物質ピーク: 凍結乾燥した組成物を8℃で12ヶ月、25℃で12ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存した時点で再溶解し、逆相クロマトグラフィーにかけ、溶出液の220nm及び270nmの吸光度を測定した場合、検出される類縁物質の量が、いずれも凍結乾燥した直後におけるものと実質的に変化しない。

2. 凍結乾燥した組成物を、8℃で36ヶ月、25℃で36ヶ月、又は40℃で6ヶ月間保存したいずれの時点においても請求項1に記載の全性質を維持していることを特徴とする、請求項1に記載の医薬組成物。

3. 類縁物質が、レシチン化スーパーオキシドジスムターゼのレシチン部分が切断されて生成した物質であることを特徴とする請求項1又は2に記載の医薬組成物。
4. 医薬組成物中の脂肪酸含量が、 $0.13 \sim 0.15 \mu\text{mol}/\text{mg}$  蛋白である請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬組成物。
5. 医薬担体がシュークロースである請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。
6. Qが $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$ である、請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物（ $n$ は2以上の整数を表す）。
7. SOD' がヒトのスーパーオキシドジスムターゼの残基である、請求項1～6いずれか1項に記載の医薬組成物。
8. SOD' がヒトのスーパーオキシドジスムターゼのアミノ酸配列111位のアミノ酸がS-（2-ヒドロキシエチルチオ）システインとなったスーパーオキシドジスムターゼ修飾体の残基である、請求項1～7のいずれか1項に記載の医薬組成物。
9. スーパーオキシドジスムターゼが、活性中心に銅と亜鉛を含むスーパーオキシドジスムターゼである、請求項7又は8に記載の医薬組成物。
10.  $n$ が2～10の整数である、請求項6～9のいずれか1項に記載の医薬組成物。
11.  $m$ が1～12の正数である、請求項1～10のいずれか1項に記載の医

薬組成物。

12. シュークロースが活性炭処理されたシュークロースである、請求項5～11のいずれか1項に記載の医薬組成物。

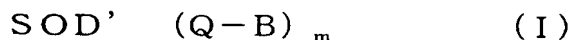
13. 凍結乾燥医薬組成物の形態である、請求項1～12のいずれか1項に記載の医薬組成物。

14. レシチン化スーパーオキシドジスムターゼとシュークロースの重量比が0.4/100～60/100である請求項5～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。

15. 請求項1～14のいずれか1項に記載の医薬組成物からなる疾患の処置剤。

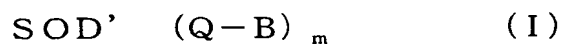
16. 疾患が運動ニューロン疾患又は潰瘍性胃腸障害である、請求項15に記載の処置剤。

17. シュークロースを有効成分とする剤であって、下記一般式(I)で表されるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼと共存させることにより該スーパーオキシドジスムターゼの活性低下を抑制し、または、該スーパーオキシドジスムターゼのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制するための剤。



(式中、SOD' はスーパーオキシドジスムターゼの残基を表し、Qは化学的架橋を表し、Bはグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基を表し、mはスーパーオキシドジスムターゼ1分子に対するリゾレシチンの平均結合数であって、1以上の正数を表す)

18. 下記一般式(I)で表されるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼにシュークロースを共存させることにより該スーパーオキシドジスムターゼの活性低下を抑制し、または、該スーパーオキシドジスムターゼのカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現を抑制する方法。



(式中、SOD' はスーパーオキシドジスムターゼの残基を表し、Qは化学的架橋を表し、Bはグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンのその水酸基の水素原子を除いた残基を表し、mはスーパーオキシドジスムターゼ1分子に対するリゾレシチンの平均結合数であって、1以上の正数を表す)



## SEQUENCE LISTING

<110> LTT Institute Co., Ltd., and Seikagaku Corporation

<120> Pharmaceutical composition containing lecithinized-superoxide  
dismutase

<130>

<160> 1

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly

1 5 10 15

Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp

20 25 30

Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His

35 40 45

Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe

50 55 60

Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His

65 70 75 80

Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala Asp

85 90 95

Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile

100 105 110

Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys

115 120 125

Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu



—

130

135

140

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln

145

150



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04138

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19, A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19, A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN) , CA (STN) , CAOLD (STN) , CAPLUS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 09-117279, A (Samu Kenkyusho K.K.), 06 May, 1997 (06.05.97) (Family: none)	1-4, 6-11, 13, 15, 16 5, 12, 14, 17, 18
X A	JP, 06-054681, A (LTT Kenkyusho K.K.), 01 March, 1994 (01.03.94) (Family: none)	1-4, 6-11, 13, 15, 16 5, 12, 14, 17, 18
A	JP, 01-304882, A (Ube Industries, Ltd.), 08 December, 1989 (08.12.89) (Family: none)	1-18
A	US, 5534251, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), 09 July, 1996 (09.07.96) & JP, 05-043478, A & WO, 93/03747, A1 & EP, 598905, A1	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 19 September, 2000 (19.09.00)	Date of mailing of the international search report 03 October, 2000 (03.10.00)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/04138

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19,  
A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19,  
A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), CAOLD (STN), CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP, 09-117279, A (株式会社サム研究所) 6. 5月. 1997 (06. 05. 97) (ファミリーなし)	1-4, 6-11, 13, 15, 16 5, 12, 14, 17, 18
X A	JP, 06-054681, A (株式会社エルティーティー研究所) 1. 3月. 1994 (01. 03. 94) (ファミリーなし)	1-4, 6, 7, 9-11, 13, 15, 16 5, 8, 12, 14, 17, 18
A	JP, 01-304882, A (宇部興産株式会社) 8. 12月. 1989 (08. 12. 89) (ファミリーなし)	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4P 9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5534251, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) 9. 7月. 1996 (09. 07. 96) &JP, 05-043478, A &WO, 93/03747, A1 &EP, 598905, A1	1-18



PTO 94-3881

Japan, Kōkai  
Hei 01-304882

METHOD OF PRESERVING HUMAN COPPER AND ZINC TYPE  
SUPEROXIDE DISMUTASE

[Hito Cu, Zn Gata Sūpāokishido Jisumutāze no Antei Hozonpō]

Kiyoshi Fukui et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C.

August 1994



Translated by: Schreiber Translations

<u>Country</u>	:	Japan
<u>Document No.</u>	:	01-304882
<u>Document Type</u>	:	Kōkai
<u>Language</u>	:	Japanese
<u>Inventor(s)</u>	:	Kiyoshi Fukui and Masayuki Watanabe
<u>Applicant(s)</u>	:	Ube Industries K.K.
<u>IPC</u>	:	C12N 9/96
<u>Application Date</u>	:	June 3, 1988
<u>Publication Date</u>	:	December 8, 1989
<u>Foreign Language Title</u>	:	Hito Cu, Zn Gata Sūpāoxishido Jisumutāze no Antei Hozonpō
<u>English Title</u>	:	METHOD OF PRESERVING HUMAN COPPER AND ZINC TYPE SUPEROXIDE DISMUTASE



1. Title: METHOD OF PRESERVING HUMAN COPPER AND ZINC TYPE  
SUPEROXIDE DISMUTASE

2. Claim

1. A method of preserving human copper and zinc type superoxide dismutase characterized in that said superoxide dismutase is mixed with at least one sugar selected from the group consisting of disaccharides, ketose monosaccharides, and sugar alcohols.

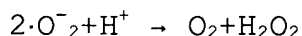
3. Detailed Description of the Invention

**Industrial Field of Application**

The present invention relates to a method employing a specified sugar to preserve human Cu and Zn type superoxide dismutase (abbreviated hereinbelow to "SOD") in a frozen state.

**Prior Art**

Human SOD is an enzyme which eliminates superoxide in the dismutation reaction shown below.



Thus, human SOD has attracted attention as a therapeutic drug effective for tissue damage (eg, inflammation, degenerative arthritis, chronic rheumatoid arthritis, damage from radiation exposure, damage from ultraviolet exposure, oxygen omental

---

<sup>1</sup> Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.



disease in immature infants, cataracts, side effects of antineoplastics such as Adriamycin, damage accompanying restoration of circulation to areas deprived of blood, and the like) in the body caused by superoxide.

No decrease in the enzymatic action of human SOD is observed when this protein is subjected to freezing and thawing or freeze-drying processes, nor is formation of insoluble matter visible to the naked eye. However, human SOD subjected to analysis by sodium dodecyl sulfate — polyacrylamide electrophoresis, high-performance gel filtration liquid chromatography, and the like produces by-products consisting mostly of dimers.

Thus, the use of human SOD in pharmaceutical products necessitates its stable storage. However, by-products resulting

/474

from the storage process may have allergenic side effects; the generation of such substances must be prevented.

Most proteins are known to generate by-products, undergo denaturation rendering them insoluble and the like, and lose their biological activity when subjected to freezing and thawing or freeze-drying processes. Such denaturation is known to be preventable by addition to the protein solution of biological polymeric compounds such as albumin, DNA, carrageenan, dextran, or starch; amino acids; polyethylene glycol; or glycerol prior to freezing and thawing or freeze-drying.

However, the use of animal-derived albumin, DNA,





carrageenan, starch and the like is undesirable in pharmaceutical products containing human SOD since such substances may be allergenic. The use of human-derived substances, presenting sourcing difficulties and highly expensive, is not practical.

Conventional methods of preserving SOD include a method (US Patent No. 3,637, 64<sup>2</sup>) of preserving bovine SOD (tradename: Orgothin<sup>3</sup>, Diagnostic Data Co.). Denaturation of bovine SOD is 25 percent or greater with freeze-drying. However, by combining pentose and hexose (for example, galactose, fructose, fucose, arabinose, glucose, mannose, and sucrose) with bovine SOD prior to freeze-drying, denaturation of bovine SOD is prevented.

However, even with the combination of aldose monosaccharides such as galactose, arabinose, glucose, and the like to human SOD prior to freeze-drying, analysis by anion-exchange chromatography reveals denaturation (Comparative Example 3). Thus, the use of aldose monosaccharides to prevent denaturation of human SOD during freezing or freeze-drying is undesirable.

#### **Problems to Be Solved by the Invention**

The object of the present invention is to provide a method of preserving in a frozen or freeze-dried state a solution of human SOD processed with specified sugars.

#### **Methods of Solving the Problems**

---

<sup>2</sup> Last digit missing in Japanese.-Tr.

<sup>3</sup> Transliteration of Orugochin in Japanese.-Tr.



As the result of extensive research conducted to solve the above-described problems, the present inventors discovered that by mixing human SOD with at least one sugar selected from the group consisting of disaccharides, ketose monosaccharides, and sugar alcohols, human SOD can be preserved in a frozen or freeze-dried state; the present invention was devised on this basis.

That is, the present invention relates to a method of preserving human SOD characterized in that human SOD is preserved by mixing it with at least one sugar selected from the group consisting of disaccharides, ketose monosaccharides, and sugar alcohols.

A quantity of sugar 0.05-10 times by weight, preferably 0.1-6 times by weight, the quantity of human SOD is employed in the present invention.

The present invention is described in greater detail below.

Human SOD suitable for use in the present invention can be extracted and refined from human cells, tissue, organs, or the like (eg, red blood cells, livers, or placentas); obtained by genetic recombination of microbes so that they produce SOD with the same amino acid sequence as human SOD; or the like.

Examples of sugars used in the present invention for the preservation of human SOD in a frozen or freeze-dried state are sugar alcohols (for example, sorbitol, mannitol, inositol, and ribitol), disaccharides (for example, sucrose, trehalose, maltose, lactose, isomaltose, cellobiose), and ketose



monosaccharides (for example, fructose, xylulose, ribulose, and sedoheptulose). These sugars can be used singly or in combination.

/475

There are no specific restrictions on the method used to mix human SOD with the above-listed sugars. Examples are:

- (a) Direct addition of sugar to an SOD solution (1-100 mg/mL) followed by intimate mixing;
- (b) Addition of a sugar solution to an SOD solution (1-100 mg/mL) followed by intimate mixing; and
- (c) Direct addition of an SOD solution to a sugar solution followed by intimate mixing.

This processing can be conducted at a temperature of 0-40°C, preferably 0-15°C. There is no specific limit to the processing time after mixing.

The solvent used with the SOD solution or sugar solution of the present invention is not specifically limited. For example, water, physiological saline, phosphate buffer solution, and other buffer solutions can be used.

A suitable quantity of the sugar-containing human SOD solution thus prepared is charged to a vial or other suitable container, frozen at a temperature of -80 to -15°C, and stored as is at -80 to -15°C, or dried under a vacuum (200-500 mTorr) and stored at -80 to -10°C. In this manner, human SOD can be preserved in a frozen or freeze-dried state.



## Embodiments

The present invention is described in detail below on the basis of reference examples and embodiments. However, these embodiments do not limit the scope of the present invention.

Testing of the embodiments by polyacrylamide electrophoresis, high-performance gel filtration liquid chromatography, and anion-exchange chromatography was conducted according to the methods indicated below:

### (1) Polyacrylamide electrophoresis

Analysis (referred to hereinbelow as "electrophoretic analysis") of by-products produced in the storage of frozen or freeze-dried human SOD processed by addition of a specified sugar was conducted based on the Remury method (*Nature*, 227, 680 (1970)).

Minislabs of gel (length: 60 mm, width: 100 mm, separation portion: 45 mm, holes: 10) having a 3 percent gel concentration and a 12.5 percent separation gel concentration were prepared, 20  $\mu$ g of denatured sample was placed into each hole, and the samples were subjected to electrophoresis with a constant current of 20 mA. The electrophoretic samples were then dyed with Komashī Brilliant Blue R-250. Human SOD was confirmed at 20 KD (kilodaltons) (monomer) and by-products were identified at 40 KD using electrophoretic molecular weight markers from Farmacia.

### (2) High-performance gel filtration liquid chromatography

Analysis by high-performance gel filtration liquid





chromatography (referred to hereinbelow as "gel filtration analysis") of by-products produced in the storage of frozen or freeze-dried human SOD processed by addition of a specified sugar was conducted in the manner indicated below.

A TSK-3000 SW column (Tōyō Sōren) and an eluant in the form of 50 mM sodium phosphate — 0.2 M sodium chloride solution (pH 7) were employed with a flow rate of 0.7 mL/min. Use of high-performance gel filtration chromatographic molecular weight markers from Oriental Enzyme Co. confirmed human SOD at 40 KD and by-products were identified at 79 KD.

### (3) Anion-exchange chromatography

Analysis by anion-exchange chromatography (referred to as DEAE analysis hereinbelow) of change occurring in the storage of frozen or freeze-dried human SOD processed by addition of a specified sugar was conducted on a TS-DEAE 5 PW column (Tōyō Sōren) in the manner indicated below.

Anion-exchange chromatography was conducted by the linear gradient method using a TS-DEAE 5 PW column and eluants in the form of an A solution (20 mM tris acetate (pH 8.5)) and a B solution (20 mM tris acetate — 0.5 M sodium acetate (pH 8.5)) (the B solution was brought from 0 percent to 15 percent over 74 min) at a flow rate of 0.8 mL/min.

### **Embodiment 1**

A 74 mg quantity of sorbitol, a sugar alcohol, was added to 0.37 mL of human SOD solution (human SOD 100 mg/1 mL of distilled



water) and distilled water was added to make 1 mL. This solution

/476

was charged to a vial, frozen at -20°C, and thawed at room temperature. The stability of human SOD when frozen and stored with the addition of sugar was examined by above-described gel permeation analysis (2) and DEAE analysis (3).

Gel permeation analysis revealed by-products at 79 KD. The quantities produced were 0.007 percent after five cycles, and 0.008 percent after 10 cycles of repeated freezing and thawing.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD.

#### **Embodiment 2**

The stability of human SOD when frozen and stored with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 1 except for the substitution of inositol, a sugar alcohol, for sorbitol.

The quantity of by-product identified at 79 KD by gel permeation analysis was 0.014 percent after five cycles, and 0.011 percent after 10 cycles of repeated freezing and thawing.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD.

#### **Embodiment 3**

The stability of human SOD when frozen and stored with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 1 except for the substitution of sucrose, a disaccharide, for sorbitol.

The quantity of by-product identified at 79 KD by gel



permeation analysis was 0.004 after five cycles and 0.008 percent after 10 cycles of repeated freezing and thawing.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD.

#### **Embodiment 4**

The stability of human SOD when frozen and stored with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 1 except for the substitution of trehalose, a disaccharide, for sorbitol.

The quantity of by-product identified at 79 KD by gel permeation analysis was 0.008 percent after five cycles, and 0.007 percent after 10 cycles of repeated freezing and thawing.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD.

#### **Embodiment 5**

The stability of human SOD when frozen and stored with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 1 except for the substitution of maltose, a disaccharide, for sorbitol.

The quantity of by-product identified at 79 KD by gel permeation analysis was 0.004 percent after five cycles, and 0.007 percent after 10 cycles of repeated freezing and thawing.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD.

#### **Comparative Example 1**

The stability of human SOD when frozen was examined in the same manner as in Embodiment 1 except for the omission of



sorbitol.

The quantity of by-product identified at 79 KD by gel permeation analysis was 0.019 percent after five cycles, and 0.028 percent after 10 cycles of repeated freezing and thawing.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD.

Table 1 shows the results of the examination of human SOD storage stability when frozen and thawed with the addition of sugars in Embodiments 1-5, and without sugar, in Comparative Example 1.

**Table 1**

Embodiment	Sugar Additive	Cycles	Test Method (2) 79 KD (%)	Test Method (3) Denaturation
1	Sorbitol	5 10	0.007 0.008	None
2	Inositol	5 10	0.004 0.011	None
3	Sucrose	5 10	0.004 0.008	None
4	Trehalose	5 10	0.008 0.007	None
5	Maltose	5 10	0.004 0.007	None
Comparative Example 1 (No Sugar)		5 10	0.019 0.028	None

**Embodiment 6**





A 100 mg quantity of sorbitol, a sugar alcohol, was added to 0.5 mL of human SOD solution (human SOD 100 mg/distilled water 1 mL) and distilled water was added to make 1 mL. The solution was charged to a vial, frozen at -80°C, and dried over night under a

/477

vacuum (200-500 mTorr). The freeze-dried human SOD obtained was dissolved in distilled water and the stability of freeze-dried human SOD was examined.

Gel permeation analysis revealed a 0.08 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 1).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 7**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of mannitol, a sugar alcohol, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.23 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 2).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 8**



The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of inositol, a sugar alcohol, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.11 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 3).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 9**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of sucrose, a disaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.04 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 4).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 10**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of trehalose, a disaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.05 percent quantity of by-product at 79 KD.



DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 5).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 11**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of maltose, a disaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.01 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 6).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 12**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of lactose, a disaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 7).

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Embodiment 13**



The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of fructose, a ketose monosaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.01 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 8).

/478

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Comparative Example 2**

The stability of freeze-dried human SOD was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the omission of sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.45 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 12)

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Comparative Example 3**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of arabinose, a monosaccharide, for





sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.03 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 9)

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Comparative Example 4**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of glucose, a monosaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.01 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD (Fig. 10)

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

#### **Comparative Example 5**

The stability of freeze-dried human SOD with the addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 6 except for the substitution of galactose, a monosaccharide, for sorbitol.

Gel permeation analysis revealed a 0.06 percent quantity of by-product at 79 KD.

DEAE analysis did not reveal any denaturation of human SOD



(Fig. 11)

Electrophoretic analysis did not reveal any by-products having a molecular weight of 40 KD.

Table 2 shows the results of the examination of freeze-dried human SOD storage stability with the addition of sugars in Embodiments 6-13 and Comparative Examples 3-5, and without sugar, in Comparative Example 2.

**Table 2**

Embodiment	Test Method (1) 40 KD	Test Method (2) 79 KD (%)	Test Method (3) Denaturation
6	None	0.08	None
7	Present	0.23	None
8	None	0.11	None
9	None	0.04	None
10	None	0.05	None
11	None	0.01	None
12	None	0	None
13	None	0.01	None
Comparative Ex. 2	Present	0.45	None
Comparative Ex. 3	None	0.03	Present
Comparative Ex. 4	None	0.01	Present
Comparative Ex. 5	None	0.06	Present

/479



#### **Embodiment 14**

A 5 mg quantity of sorbitol, a sugar alcohol, was added to 0.5 mL of human SOD solution (human SOD 100 mg/distilled water 1 mL) and distilled water was added to make 1 mL. The solution was charged to a vial, frozen at -20°C, and dried over night under a vacuum (200-500 mTorr). The freeze-dried human SOD obtained was dissolved in distilled water and the stability of freeze-dried human SOD examined.

Gel permeation analysis revealed a 0.236 percent quantity of by-product at 79 KD.

#### **Embodiment 15**

The stability of freeze-dried human SOD with addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 14 with the exception that 12.5 mg of sorbitol was employed.

Gel permeation analysis revealed a 0.104 percent quantity of by-product at 79 KD.

#### **Embodiment 16**

The stability of freeze-dried human SOD with addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 14 with the exception that 25 mg of sorbitol was employed.

Gel permeation analysis revealed a 0.065 percent quantity of by-product at 79 KD.

#### **Embodiment 17**

The stability of freeze-dried human SOD with addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 14 with



the exception that 50 mg of sorbitol was employed.

Gel permeation analysis revealed a 0.038 percent quantity of by-product at 79 KD.

#### **Embodiment 18**

The stability of freeze-dried human SOD with addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 14 with the exception that 100 mg of sorbitol was employed.

Gel permeation analysis revealed a 0.012 percent quantity of by-product at 79 KD.

#### **Embodiment 19**

The stability of freeze-dried human SOD with addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 14 with the exception that 200 mg of sorbitol was employed.

Gel permeation analysis revealed a 0.026 percent quantity of by-product at 79 KD.

#### **Embodiment 20**

The stability of freeze-dried human SOD with addition of sugar was examined in the same manner as in Embodiment 14 with the exception that 300 mg of sorbitol was employed.

Gel permeation analysis revealed 0 percent by-product at 79 KD.

#### **Comparative Example 6**

The stability of freeze-dried human SOD was examined in the same manner as in Embodiment 14 with the exception that sorbitol was omitted.





Gel permeation analysis revealed a 0.425 percent quantity of by-product at 79 KD.

Table 3 and Fig. 13 show the results of the examination of freeze-dried human SOD storage stability with the addition of sugars in Embodiments 14-20 and without sugar in Comparative Example 6.

**Table 3**

Embodiment	Human SOD (mg)	Sorbitol (mg)	Test Method (2) 74 KD (%)
14	50	5	0.236
15	50	12.5	0.104
16	50	25	0.065
17	50	50	0.038
18	50	100	0.012
19	50	200	0.026
20	50	300	0
Comparative Ex. 6	50	0	0.426

### **Effect of the Invention**

Preservation of frozen or freeze-dried human SOD is possible by the method of the present invention (ie, a method by which human SOD is processed by mixing it with at least one sugar selected from the group consisting of disaccharides, ketose monosaccharides, and sugar alcohols to obtain a solution which is then frozen or freeze dried).

/480

### **4. Brief Description of the Figures**



Fig. 1 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 6.

Fig. 1 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 6.

Fig. 2 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 7.

Fig. 3 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 8.

Fig. 4 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 9.

Fig. 5 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 10.

Fig. 6 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 11.

Fig. 7 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 12.

Fig. 8 shows the results of the DEAE analysis recorded in Embodiment 13.

Fig. 9 shows the results of the DEAE analysis recorded in Comparative Example 3.

Fig. 10 shows the results of the DEAE analysis recorded in Comparative Example 4.

Fig. 11 shows the results of the DEAE analysis recorded in Comparative Example 5.

Fig. 12 shows the results of the DEAE analysis recorded in



Comparative Example 2.

Fig. 13 shows the results of examination of the storage stability of freeze-dried human SOD with sugar addition in Embodiments 14-20 and without sugar in Comparative Example 6.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

/481

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

/482

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13

/483

#### CERTIFICATE OF CORRECTION (Form)

September 27, 1988

Commissioner of Patents:

#### 1. Designation of Document

Patent Application No. 63-135457

#### 2. Title of the Invention

Method of Preserving Human Copper and Zinc Type Superoxide  
Dismutase

#### 3. Party Making Corrections

Relation to Document: Applicant

(02) Ube Industries, K.K.

1-12-32 Nishiki-machi, Ube-shi,  
Yamaguchi-ken



Postal Code 765

Yasuo Kiyomizu, Agent

**4. Date of Correction Order**

Date mailed: August 30, 1988

/484





5. Number of Inventions Added in Corrections: None

6. Object of Correction:

Figures

7. Content of Corrections

(1) Figures 1-13 are hereby corrected as per accompanying sheets.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

/485

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

/486

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

/487

Fig. 12

Fig. 13

[#left] Amount Produced (%)

[#bottom] Sorbitol/Human SOD (W/W)



E P

US

P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)  
[PCT 18 条、PCT 規則 43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 SE 20005 PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04138	国際出願日 (日.月.年) 23.06.00	優先日 (日.月.年) 24.06.99
出願人 (氏名又は名称) 生化学工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☐ 出願人が提出したものを承認する。

☒ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (PCT 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

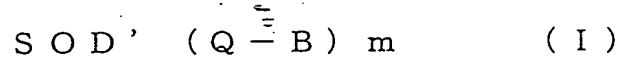
☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## 第Ⅲ欄 要約 (第1ページの5の続き)

下記一般式 (I) :



(式中、SOD' はスーパーオキシドジスムターゼの残基を、Qは化学的架橋を、Bはグリセロールの2位に水酸基を有するリゾレシチンからその水酸基の水素原子を除いた残基を、mは1以上の正数を表す) で表されるレシチン化スーパーオキシドジスムターゼ (PC-SOD) 及び医薬担体を含有し、特定の性状、安定性等を有する医薬組成物が提供される。本発明医薬組成物は、組成物中のシュークロースの作用により、長期間保存によるPC-SODの活性低下が少なく、凍結乾燥した場合の性状が良好で、かつカラムクロマトグラフィーによる分析の際の類縁物質ピークの出現が抑制されており、医薬品の成分として有用である。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19,  
A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19,  
A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), CAOLD (STN), CAPLUS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	JP, 09-117279, A (株式会社サム研究所) 6. 5月. 1997 (06. 05. 97) (ファミリーなし)	1-4, 6-11, 13, 15, 16 5, 12, 14, 17, 18
X A	JP, 06-054681, A (株式会社エルティーティー研究所) 1. 3月. 1994 (01. 03. 94) (ファミリーなし)	1-4, 6, 7, 9-11, 13, 15, 16 5, 8, 12, 14, 17, 18
A	JP, 01-304882, A (宇部興産株式会社) 8. 12月. 1989 (08. 12. 89) (ファミリーなし)	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 09. 00

国際調査報告の発送日

03.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US, 5534251, A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) 9. 7月. 1996 (09. 07. 96) &JP, 05-043478, A &WO, 93/03747, A1 &EP, 598905, A1	1-18



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 06 March 2001 (06.03.01)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/04138	<b>Applicant's or agent's file reference</b> SE20005PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 24 June 1999 (24.06.99)
<b>Applicant</b> IKEDA, Yoshihito et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 January 2001 (22.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Takeshi  
Masukichi Building  
3rd Floor  
6-10, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPONDate of mailing (day/month/year)  
06 December 2001 (06.12.01)Applicant's or agent's file reference  
SE20005PCT

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.  
PCT/JP00/04138International filing date (day/month/year)  
23 June 2000 (23.06.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

SEIKAGAKU CORPORATION  
1-5, Nihonbashi-Honcho 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-0023  
JapanState of Nationality  
JPState of Residence  
JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

IGARASHI, Rie  
8-2, Minamiikuta 5-chome  
Tama-ku  
Kawasaki-shi  
Kanagawa 214-0036  
JapanState of Nationality  
JPState of Residence  
JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Susumu KUBO

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Takeshi  
Masukichi Building  
3rd Floor  
6-10, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
JAPON

Date of mailing (day/month/year)

06 December 2001 (06.12.01)

Applicant's or agent's file reference

SE20005PCT

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/JP00/04138

International filing date (day/month/year)

23 June 2000 (23.06.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address

1) TADA, Kimiko 2) MIYAGAWA, Keizo  
Ishigaki Building 2F  
519, Waseda Tsurumakicho  
Shinjuku-ku, Tokyo 162-0041  
Japan

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

03-3205-5950

Facsimile No.

03-3205-5951

Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

1) TAKAHASHI, Takeshi 2) TAKAHASHI, Masakazu  
Masukichi Building  
3rd Floor  
6-10, Nihonbashi 3-chome  
Chuo-ku  
Tokyo 103-0027  
Japan

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

03-3281-7994

Facsimile No.

03-5205-0188

Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Susumu KUBO

Telephone No.: (41-22) 338.83.38





PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 21 SEP 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 SE20005PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04138	国際出願日 (日.月.年) 23.06.00	優先日 (日.月.年) 24.06.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> A61K38/44, A61K47/26, A61K9/19, A61P43/00, A61P1/04, A61P25/00		
出願人(氏名又は名称) 生化学工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で          ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.01.01	国際予備審査報告を作成した日 06.09.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 榎本 佳予子 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4P 9638



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

5, 12, 14, 17, 18

有

請求の範囲

1-4, 6-11, 13, 15, 16

無

進歩性(IS)

請求の範囲

5, 12, 14, 17, 18

有

請求の範囲

1-4, 6-11, 13, 15, 16

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-18

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

## (文献)

1. JP 09-117279 A (株式会社サム研究所) 6.5月.1997(06.05.97)
2. JP 06-054681 A (株式会社エルティーティー研究所) 1.3月.1994(01.03.94)
3. JP 01-304882 A (宇部興産株式会社) 8.12月.1989(08.12.89)
4. US 5534251 A (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) 9.7月.1996(09.07.96)

## (説明)

・請求の範囲1-4、6-11、13、15及び16について

請求の範囲1-4、6-11、13、15及び16に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2から新規性及び進歩性を有しない。

文献1及び2には、レンチン化スーパーオキシドジスムターゼを有効成分として含有する医薬組成物が記載されており、製剤の一形態である注射剤は、上記有効成分と安定化剤等の添加剤を注射用蒸留水に溶解し、アンプル等に分注して凍結乾燥することにより調整されることも記載されていることから、本願の請求の範囲に記載された発明がこれらと相違するものとは直ちには認められない。

また、上記安定化剤等の添加剤を適宜選択して、安定性に優れた医薬組成物とすることも、当業者が容易に想到し得たことである。

・請求の範囲5、12、14、17及び18について

請求の範囲5、12、14、17及び18に係る発明は、国際調査報告で引用された何れの文献にも開示されておらず、新規性を有する。

また、請求の範囲5、12、14、17及び18に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2に対して進歩性を有する。文献1及び2には、安定化剤としてシュークロースを用いることが記載されておらず、一方、本願発明はそれにより、ソルビトール等の他の添加剤を用いたときよりも格別に優れた安定性と性状を示すという有利な効果を発揮する。

